

3/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0013128305

WPI ACC NO: 2003-210362/200320

XRAM Acc No: C2003-053740

Method for amplifying non-cyclic nucleic acid fragments with
single-stranded target nucleic acid fragment as template, applicable in
e.g. gene analysis, disease diagnosis and identification of pathogenic
microbes

Patent Assignee: WAKUNAGA PHARM CO LTD (WAKT); WAKUNAGA SEIYAKU KK (WAKT)

Inventor: YAMANE A

Patent Family (3 patents, 98 countries)

Patent			Application			
Number	Kind	Date	Number	Kind	Date	Update
WO 2003004642	A1	20030116	WO 2002JP6911	A	20020708	200320 B
AU 2002315817	A1	20030121	AU 2002315817	A	20020708	200452 E
JP 2005052002	A	20050303	JP 2001206389	A	20010706	200517 E

Priority Applications (no., kind, date): JP 2001206389 A 20010706

Patent Details

Number	Kind	Lan	Pg	Dwg	Filing Notes
WO 2003004642	A1	JA	31	8	
National Designated States, Original: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW					
Regional Designated States, Original: AT BE BG CH CY CZ DE DK EA EE ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SK SL SZ TR TZ UG ZM ZW					
AU 2002315817	A1	EN			Based on OPI patent WO 2003004642
JP 2005052002	A	JA	15		

Alerting Abstract WO A1

NOVELTY - A method for amplifying a nucleic acid fragment comprises using
a non-cyclic single-stranded target nucleic acid as template and performing
a strand displacement primer elongation reaction with use of a first primer
having a sequence complementary to the target nucleic acid fragment to form
a nucleic acid fragment.

DESCRIPTION - A method for amplifying a nucleic acid fragment comprises
using a non-cyclic single-stranded target nucleic acid as template and
performing a strand displacement primer elongation reaction with use of a
first primer having a sequence complementary to the target nucleic acid
fragment to form a nucleic acid fragment, in which the nucleic acid
fragment is amplified by continuously forming fragments as repeated
sequences complementary to the nucleic acid sequence containing
inconsecutive sequences formed by the target nucleic acid fragment.

An INDEPENDENT CLAIM is also included for a similar method in which
second, third and fourth primers are also used in addition to the first
primer.

USE - The method is for amplifying non-cyclic nucleic acid fragments,
which is applicable in e.g. gene analysis, disease diagnosis and
identification of pathogenic microbes.

ADVANTAGE - The amplification can be efficiently performed.

Title Terms /Index Terms/Additional Words: METHOD; AMPLIFY; NON; CYCLIC;
NUCLEIC; ACID; FRAGMENT; SINGLE; STRAND; TARGET; TEMPLATE; APPLY; GENE;
ANALYSE; DISEASE; DIAGNOSE; IDENTIFY; PATHOGEN; MICROBE

Class Codes

International Classification (Main): C12N-015/09

(Additional/Secondary): C12Q-001/68

File Segment: CPI

DWPI Class: B04; D16

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-52002

(P2005-52002A)

(43) 公開日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.⁷
C12N 15/09F1
C12N 15/00 ZNAAテーマコード(参考)
4B024

審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2001-206389 (P2001-206389)	(71) 出願人	000250100 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号
(22) 出願日	平成13年7月6日(2001.7.6)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
		(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
		(74) 代理人	100111730 弁理士 伊藤 武彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非環状核酸断片の増幅方法

(57) 【要約】

【課題】 非環状一本鎖目的核酸断片を鋳型とし、鎖置換プライマー伸長反応により目的核酸断片と相補的な核酸断片を形成させ、増幅させる方法を提供すること。

【解決手段】 非環状一本鎖目的核酸断片を鋳型とし、かつ、前記目的核酸断片と相補的な配列を有する第1のプライマーを用いて、鎖置換プライマー伸長反応を行うことにより前記目的核酸断片と相補的な核酸断片を形成させることを含んでなる、核酸断片の増幅方法であって、前記目的核酸断片により形成される非連続配列を含む核酸配列に対して相補的な断片を、繰り返し配列として連続的に形成させることによって目的核酸断片を増幅させる、方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非環状一本鎖目的核酸断片を鋳型とし、かつ、前記目的核酸断片と相補的な配列を有する第 1 のプライマーを用いて、鎖置換プライマー伸長反応を行うことにより前記目的核酸断片と相補的な核酸断片を形成させることを含んでなる、核酸断片の増幅方法であって、前記目的核酸断片により形成される非連続配列を含む核酸配列に対して相補的な断片を、繰り返し配列として連続的に形成させることによって目的核酸断片を増幅させる、方法。

【請求項 2】

第 1 のプライマーが、その 5' 末端側に、非環状一本鎖目的核酸断片の 5' 末端側と相補的な配列を有し、かつ、その 3' 末端側に、非環状一本鎖目的核酸断片の 3' 末端側と相補的な配列を有する、請求項 1 に記載の増幅方法。 10

【請求項 3】

非環状一本鎖目的核酸断片が、その両端に互いに相補的な配列を有して、ループ及びステム構造を形成するものであって、第 1 のプライマーが、そのプライマーの 5' 末端側に、前記ループ構造部分の 5' 末端側と相補的な配列を有し、かつ、その第 1 のプライマーの 3' 末端側に、前記ループ構造部分の 3' 末端側と相補的な配列を有する、請求項 1 に記載の増幅方法。

【請求項 4】

非環状一本鎖目的核酸断片がその両端に互いに同一の配列部分を有し、かつ、第 1 のプライマーが前記非環状一本鎖核酸断片と相補的である任意の配列からなる、請求項 1 に記載の増幅方法。 20

【請求項 5】

非環状一本鎖目的核酸断片が、その両端に、互いに同一の配列と、さらにそれを挟む形で両端に互いに相補的な配列とを有して、この相補的な配列によりループ及びステム構造を形成するものであり、かつ、第 1 のプライマーが前記非環状一本鎖核酸断片のループ形成部分と相補的である任意の配列からなる、請求項 1 に記載の増幅方法。

【請求項 6】

非環状一本鎖目的核酸断片が鎖置換プライマー伸長反応により調製されたものである、請求項 1 ～ 5 項いずれか一項に記載の増幅方法。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 項いずれか一項に記載の増幅方法により得られた核酸断片を、非環状一本鎖目的核酸断片として用い、繰り返し増幅させることを含んでなる、核酸断片の増幅方法。 30

【請求項 8】

非環状一本鎖目的核酸断片が、その両端に互いに相補的な配列を有して、ループ及びステム構造を形成するものである場合は、前記非環状一本鎖核酸断片のループ形成部分から選択される任意の配列を、鎖置換プライマー伸長反応における第 2 のプライマーとして用い、または、非環状一本鎖目的核酸断片がループ及びステム構造を形成しない場合は、前記非環状一本鎖核酸断片から選択される任意の配列を、鎖置換プライマー伸長反応における第 2 のプライマーとして用いる、請求項 1 ～ 7 項のいずれか一項に記載の増幅方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の背景】****発明の分野**

本発明は、目的とする非環状一本鎖核酸断片を鋳型とした核酸断片の増幅方法に関する。

【0002】**技術背景**

ヒトゲノム配列のほぼ全容が明らかとなり、また SNP 解析も巨大プロジェクトで進められている今日において、遺伝子検出または SNP 検出の簡易化もしくは低コスト化は、遺伝子診断を実用化するためにますます重要な課題となっている。

【0003】

060804-1.txt

Manual Codes (CPI/A-M): B04-E02; B04-E03; B11-C08E3; B12-K04A4; B12-K04F;
D05-H09; D05-H12; D05-H12D1; D05-H18B

通常、遺伝子検出を行うにあたっては、検出しようとする微量の遺伝子を何らかの方法で増幅しなければならない。このような増幅の方法としては、一般的に、検出のためのシグナルを増幅する方法と、遺伝子そのものを増幅する方法とがあるが、現在のところ後者の方に実用的なものが多い。

【0004】

遺伝子を増幅する方法としては、所謂PCR法(Polfs, A. et al., PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer-Verlag (1992))が最も普及しており、ヒトゲノム配列の解析においても不可欠な技術となっている。しかしながら、従来のPCR法にはいくつかの改善が求められる点があり、そのような改善をするために種々の遺伝子増幅手段が考え出されている。なかでも、等温増幅法は温度調節を必要としないため注目を集めている。

10

【0005】

等温増幅法として代表的な方法としては、例えば、NASBA法(Gabrielle, M. E. et al., J. General Microbiol. 139, 2423-2429 (1993))、TMA法(Kacian, D. L., 米国特許第5,399,491号)およびSDA法(Walker G. T. et al., Nucleic Acids Res. 20, 1691-1696 (1992))が挙げられ、これらは遺伝子診断法としても実用化されている。しかしながら、これらの方法は複数の酵素を使うため、反応系が複雑となり、またコストが高くなってしまう。

20

【0006】

また、等温増幅法の別法として、例えば、RCA法(Lizardi, P. M. et al., Nature Genetics 19, 225-232 (1998))やLAMP法(Notomi, T. et al., Nucleic Acids Res. 28, e63 (2000))も開発されている。RCA法は環状のDNAプローブを鋳型として増幅する方法であり、リガーゼ反応と組み合わせることによりSNP検出に有効な方法であるとされている。また、LAMP法は単一の酵素で等温増幅できる方法であるが、本出願人の知る限り、現在までのところ一般には普及しておらず正確な特性については明らかでない。

【0007】

一方、Hafnerらは、直鎖状の2本鎖DNAを鋳型としローリングサークルアンプリフィケーション様の反応が起こることを見出している(Biotechniques 30, 852-867 (2001))。しかしながら、この手法では、反応生成物は非特異的であるため、特定の配列を選択的に増幅することは困難である。

30

【0008】

【発明の概要】

一般的に一本鎖環状DNAを鋳型とし、鎖置換活性のあるDNAポリメラーゼでプライマー伸長反応を行うと、伸長反応により先に合成された鎖が解離するために環状DNA配列の繰り返し構造をもつ直鎖DNAが得られることが知られている(Landegren, U. et al., Nucleic Acids Res. 26, 5073-5078 (1998))。

40

【0009】

本発明者等は、今般、プライマーを特定な位置に設定したり、目的核酸断片に特定の配列を導入することにより、非環状一本鎖DNAであっても同様な繰り返し構造が得られることを見出した。すなわち、DNAポリメラーゼが図1に示したように鎖置換伸長反応に際し、鋳型となる鎖がニック様構造、すなわちリン酸ジエステル結合を形成していない構造であっても、鋳型に対応する塩基を付加して伸長反応が進むことを見出した。これにより、目的とする非環状の一本鎖核酸断片(以下において、目的核酸断片ということがある)を鋳型として、鎖置換プライマー伸長反応により目的核酸断片を連続的に繰り返し増幅することができた。本発明はかかる知見に基づくものである。

【0010】

50

よって、本発明は、非環状一本鎖目的核酸断片を鋳型として、鎖置換プライマー伸長反応により目的核酸断片と相補的な核酸断片を形成させて、増幅させる方法の提供を目的とする。

したがって、本発明による核酸断片の増幅方法は、非環状一本鎖目的核酸断片を鋳型とし、かつ、前記目的核酸断片と相補的な配列を有する第1のプライマーを用いて、鎖置換プライマー伸長反応を行うことにより前記目的核酸断片と相補的な核酸断片を形成させることを含んでなる、核酸断片の増幅方法であって、前記目的核酸断片により形成される非連続配列を含む核酸配列に対して相補的な断片を、繰り返し配列として連続的に形成させることによって目的核酸断片を増幅させる方法である。

10

【0011】

【発明の具体的な説明】

【0012】

本発明において、「目的核酸断片により形成される非連続配列」とは、前記したように相補鎖を形成させる鋳型配列が、ニック様構造、すなわち塩基配列としては連続して配置されているがそのある一部において隣り合う塩基間でリン酸ジエステル結合を形成していない構造を含んでいる配列のことをいう。具体的には例えば、非環状一本鎖目的核酸断片の5'末端と、3'末端が、近接することにより、該核酸断片が環状構造を形成するような場合における、該両末端の近接部分の配列が挙げられ、また、非環状一本鎖目的核酸断片がその両端に互いに相補的な配列を有してループ及びステム構造を形成している場合において、そのループ構造配列に着目した場合に、ステム形成部分との境界で生ずる、ループ構造配列における不連続部分が挙げられる。

20

本発明において、「繰り返し配列として連続的に形成させる」とは、非環状一本鎖目的核酸断片をタンデム状の繰り返し配列として生成させ、同じ核酸断片を連続的に形成させることをいう。したがって、例えば、後述するプライマーを特定な位置に設定する場合の好ましい態様（図2参照）ような場合には、非環状一本鎖目的核酸断片の5'末端と3'末端が近接して環状配列に類似した配列を形成し、これに相補的な配列が鎖置換伸長反応により形成されるが、このとき、形成される目的核酸断片は、環状配列に類似した配列に対してまず一つ分形成され、それに引き続いて、伸長反応が環状配列に類似した配列をトレースするように、次々に目的核酸断片が形成されると考えられる。このようにして形成された目的核酸断片は、一単位分の断片を繰り返し有するような形で連続して得られることとなる。なお、例えば後述する目的核酸断片に特定の配列を導入する場合における態様のよう（図4参照）場合には、目的核酸断片は互いに同一の配列部分をその両端に有するが、核酸断片が増幅されるときには、この同一配列の一方のみは短絡されて残り配列が繰り返し形成されることとなる。

30

【0013】

本発明において、適用可能な非環状一本鎖目的核酸断片としては、その塩基配列が判明しているものであれば特に限定されるものではなく、RNAまたはDNAのいずれであっても良い。またこの目的核酸断片は、その由来によって制限されるものではなく、従って本発明は、真核生物、原核生物、ウイルス由来の核酸、さらには合成されたものに対しても適用可能である。

40

【0014】

RNAを直接増幅のターゲットとする場合は、RNAを鋳型としてDNA鎖を合成するリバーストランスクリプターゼや、ある種のRNAを鋳型としてDNA合成可能なDNAポリメラーゼを使用することができる。また、目的のRNAから相補的なDNAを合成した場合や、最初からDNAを増幅のターゲットとする場合はDNAポリメラーゼを使用することができる。

【0015】

鎖置換プライマー伸長反応においては、使用されるポリメラーゼは、鎖置換活性を少なくとも有するものであれば、特に制限はなく、そのような活性を有する酵素であればいずれ

50

のものも使用可能である。

そのようなポリメラーゼとしては、RNAを直接増幅する場合は、例えば、鎖置換活性のあるリバーストランスクリプターゼであるM-MuLV リバーストランスクリプターゼなどを用いることができる。また、DNAを増幅する場合は、例えば、Klenow Fragment、Vent DNA ポリメラーゼ、Φ29 DNAポリメラーゼやBst DNAポリメラーゼなどの鎖置換活性をもつDNAポリメラーゼを使用することができるが、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いたものが好ましい。なお、その活性の有無については酵素販売会社のカタログに記載されている。

【0016】

本発明の非連続な鋳型に連続的な相補鎖を合成する反応においては、該反応と鎖置換活性は矛盾する反応とも考えられる (Canceill, D. et al., J. Biol. Chem. 274, 27481-27490 (1999))。すなわち、鎖置換反応が強すぎると該反応の効率が低下することが考えられる。そのような場合、反応温度または反応液中の塩濃度などにより鎖置換活性をコントロールすることもできる。また必要により、鎖置換活性の異なるポリメラーゼを複数同時に使用してもよい。

【0017】

鎖置換プライマー伸長反応の反応温度は、使用する酵素に応じその最適な温度にしたがって、適宜選択可能であるが、通常は、プライマー伸長反応の特異性を高めるためには比較的高い温度が好ましい。そのような場合はその温度にふさわしい耐熱のDNAポリメラーゼを使う必要がある。

【0018】

本発明において使用されるプライマーとしては、一般のプライマー伸長反応、たとえばポリメラーゼチェーンリアクションに使用されている公知のものであればいずれのものを使用可能である。

使用されるプライマーの鎖長は、一般的な使用法に準じて適宜選択可能である。本発明においては、第1のプライマーの鎖長は、典型的には4～100塩基であり、好ましくは10～30塩基である。

【0019】

プライマーに非連続な目的核酸断片の5'末端側と3'末端側を近づける作用をもたせる時は、該反応条件下でその構造を安定に保持できるものであることが望ましい。また、目的核酸断片と相補的な配列を有するプライマーおよび目的核酸断片と同一の配列からなるプライマーの両方を使用する場合は、これら両方は必ずしも目的核酸断片の別の位置に相当する必要はなく、互いに相補的なものであってもよい。また、増幅反応の効率を高めるため、目的核酸断片と相補的な配列を有するプライマーおよび目的核酸断片と同一の配列からなるプライマーの両方、またはいずれか一方を複数種混合して使用してもよい。

【0020】

以下、本発明による核酸断片の増幅方法を、プライマーを特定な位置に設定する場合と、目的核酸断片に特定の配列を導入する場合に分けて順に説明する。

【0021】

プライマーを特定な位置に設定する場合

本発明の好ましい態様によれば、増幅させようとする目的核酸断片の5'末端側と3'末端側との双方に相補的なオリゴヌクレオチドを第1のプライマーとして用意し、これに鎖置換活性のあるポリメラーゼと伸長反応の基質を共存させて伸長反応を行うことにより、目的核酸断片の非連続な5'末端側と3'末端側はオリゴヌクレオチドを介して近くに配置されポリメラーゼによって、それに対応する連続した相補鎖として合成され、環状DNAを用いた時と同様の生成物を得ることができる(図2)。そのため、該反応に使用する第1のプライマーは、目的核酸断片の5'末端側と相補的な配列を該プライマーの5'末端側に有し、かつ、目的核酸断片の3'末端側と相補的な配列を該プライマーの3'末端側に有するように設計されていることが好ましい。

【0022】

したがって本発明の好ましい第1の態様によれば、第1のプライマーは、その5'末端側に、非環状一本鎖目的核酸断片の5'末端側と相補的な配列を有し、かつ、その3'末端側に、非環状一本鎖目的核酸断片の3'末端側と相補的な配列を有する。

【0023】

また、使用するプライマーによって互いに引き寄せられた目的核酸断片の非連続な5'末端側と3'末端側は、鎖置換伸長反応の条件によっては不安定となり、連続的な相補鎖が形成される前に解離する可能性がある。このため必要に応じて、目的核酸断片の両末端側に互いに相補的な配列を導入してループ及びステム構造を形成させてもよい(図3)。

すなわち、本発明の好ましい第2の態様によれば、非環状一本鎖目的核酸断片は、その両端に互いに相補的な配列を有して、ループ及びステム構造を形成するものであって、第1のプライマーは、そのプライマーの5'末端側に、前記ループ構造部分の5'末端側と相補的な配列を有し、かつ、その第1のプライマーの3'末端側に、前記ループ構造部分の3'末端側と相補的な配列を有する。

10

【0024】

このようなステム構造はグアニンやシトシン塩基に富む配列にすることにより安定性を高めることができる。また、その様な構造を形成させるためには、目的核酸断片のなかで互いに相補的な配列を両末端側に見出してそれを利用するか、または予めプライマーにそのような配列を導入してこれを利用して得てもよい。さらには、核酸断片の相補鎖以外に、たとえばタンパク-タンパクの相互作用、あるいはタンパク-核酸の特異的な相互作用を利用することも可能である。したがって、使用する第1のプライマーは、ループ部分の5'末端側と相補的な配列を該プライマーの5'末端側に有し、かつ、ループ部分の3'末端側と相補的な配列を該プライマーの3'末端側に有するように設計されているものであることが好ましい。

20

【0025】

目的核酸断片に特定の配列を導入する場合

本発明の別の好ましい態様によれば、非環状一本鎖目的核酸断片がその両端に互いに同一の配列部分を有し、かつ、第1のプライマーが前記非環状一本鎖核酸断片と相補的である任意の配列からなる、目的核酸断片の増幅方法が提供される。

すなわち、目的核酸断片の5'末端側と3'末端側とに互いに同一の配列を導入しておき、目的核酸断片と相補的な任意の配列(好ましくはオリゴヌクレオチド配列)をプライマーとして使用することにより、目的核酸断片と相補的な配列を有する核酸断片を連続的に繰り返し増幅させることができる。

30

【0026】

この方法は上述した方法とは異なり、プライマーとなるオリゴヌクレオチドは必ずしも目的核酸断片の5'末端側と3'末端側とに相補的な配列である必要がなく、目的核酸断片の連続する部分に相補的な配列であってもよい。

具体的には、プライマー伸長反応が目的核酸断片の5'末端側で一度停止し、合成された目的核酸断片の5'末端側と相補的な配列が目的核酸断片の3'末端側に存在する同一の配列とハイブリダイズして、伸長反応を再開すること考えられ、この反応を自発的に繰り返すことにより目的核酸断片を連続的に繰り返し増幅せることができると考えられる(図4)(なお、以上の記載は本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない)。

40

そのため、前記同一の配列は、その一方は目的核酸断片の5'末端側に位置する必要がある、もう一方は3'末端側に位置する必要がある。好ましくは、両末端側に存在し、その鎖長は、典型的には2~1000塩基程度の長さがあればよい。好ましくは、前記同一の配列の鎖長は4~100塩基であり、より好ましくは、8~30塩基である。

【0027】

本発明の別のより好ましい態様によれば、非環状一本鎖目的核酸断片は、その両端に、互いに同一の配列と、さらにそれを挟む形で両端に互いに相補的な配列とを有して、この相補的な配列によりループ及びステム構造を形成するものであり、かつ、第1のプライマー

50

は前記非環状一本鎖核酸断片のループ形成部分と相補的である任意の配列からなる。
すなわち、目的核酸断片の両端にある同一の配列を挟む形で互いに相補的な配列を設け、ループ及びステム構造を形成させることにより、自発的な組換えの効率をさらに高めることができる(図5)。これらの配列は目的核酸断片の配列から選択することができるが、適切な配列が目的核酸断片に存在しない場合は、プライマーの末端側にそれらの配列を導入しておき、プライマー伸長反応を行うことによって目的核酸断片から同一の配列や互いに相補的な配列を含む生成物を合成し、それを鋳型とすることもできる。

【0028】

以上のようにして、目的核酸断片を鋳型とし、また第1のプライマーを用いた鎖置換プライマー伸長反応によって、該目的核酸断片と相補的な核酸断片を連続的に繰り返し増幅することが可能であるが、必要により、その反応において目的核酸断片と同じ配列のオリゴヌクレオチドを第2のプライマーとして加えることにより、増幅効率を飛躍的に高めることができる。さらに自発的な組換えの効率を高める目的で、相同組換えに係る RecA タンパクなどを加えることもできる。

10

【0029】

非環状一本鎖目的核酸断片が、その両端に互いに相補的な配列を有して、ループ及びステム構造を形成するものである場合には、前記非環状一本鎖核酸断片のループ形成部分から選択される任意の配列を、鎖置換プライマー伸長反応における第2のプライマーとして用いることが好ましい。また、非環状一本鎖目的核酸断片がループ及びステム構造を形成しない場合には、前記非環状一本鎖核酸断片から選択される任意の配列を、鎖置換プライマー伸長反応における第2のプライマーとして用いることが好ましい。

20

【0030】

本発明の一つの好ましい態様によれば、下記のように4種類のプライマー(プライマー1~4)を用いて、本発明の方法を適用し核酸断片を増幅することができる(図6)。まず目的核酸断片に互いに相補的な配列を導入するためのプライマーとして、プライマー2を用意し、該プライマーを用いて伸長反応を行うことにより目的核酸断片の5'末端側と3'末端側に互いに相補的な配列を導入する。その後、プライマー2の上流に位置するプライマー1により鎖置換反応が起こり、プライマー2の伸長生成物は一本鎖になった後、ループ及びステム構造を取る。さらにループ部分の5'末端側と3'末端側に相補的なプライマー3と目的核酸断片の一部であるプライマー4により、鎖置換反応を行うことにより、目的とするユニットを連続的に繰り返し増幅することができる。

30

【0031】

また、目的核酸断片が非環状二本鎖であっても、これら4種類のプライマーを該目的核酸断片と混合して変性しアニーリングした後、伸長反応を行えば、同様にプライマー2からの伸長生成物はプライマー1からの伸長反応によって一本鎖核酸断片に遊離される。ここで遊離した一本鎖核酸断片は末端側に互いに相補的な配列をもち、自発的にステム構造を形成する。さらに、過剰に存在し遊離状態のプライマー3は、ステム構造を形成した一本鎖核酸断片のステム構造の両端部分にハイブリダイズしてその3'末端側から伸長反応を開始する。この伸長反応はプライマーの5'末端側まで到達すると、そこからは既に存在する相補鎖を押し分けながら(鎖置換)伸長反応を続行する。さらに伸長反応がステム部分に到達すると、伸長反応はステム部分には向かわないで、ステム部分を飛び越したかたちで(ステムを形成する相補鎖の5'側末端のすぐとなりの塩基に)相補的な塩基を付加する。その後、同様の反応を繰り返し、目的核酸断片を連続して生成する。ここで、生成した目的核酸断片はその大部分が一本鎖であり、プライマー4はこの目的核酸断片にハイブリダイズする。プライマー4は目的核酸断片を繰り返し含む一本鎖核酸断片の目的核酸断片すべてに相補的であり、ここでも鎖置換反応が開始され、目的核酸断片に相補的な一本鎖核酸断片が生成する。従って、プライマー3はこれらにも相補的であり、ここでも鎖置換を伴う伸長反応が開始され、結果として目的配列を含む伸長反応が爆発的に起こる。なお、ここでは順序だてて説明を行ったが、実際にはほとんど同時に反応は進行していると考えられる。

40

50

【0032】

核酸断片の検出

本発明により増幅された目的核酸断片の検出は、核酸断片検出に利用されている一般的な技術であればいずれの方法であっても適用することができる (Keller, G. H., Manak, M. M. DNA Probes Stockton Press (1993))。増幅された目的核酸断片の検出法としては、例えば、増幅反応液の一部を電気泳動にかけ染色剤で増幅した核酸断片を検出する方法が挙げられる。また、目的核酸断片鎖に制限酵素の認識部位が存在する場合には、その制限酵素で消化し、同様に電気泳動で検出してもよい。さらに、電気泳動後プローブ法により増幅された核酸断片が目的配列を含むか否かを確認してもよい。

10

【0033】

一般的に、核酸断片の増幅反応においては増幅生成物が次の反応に混入し、誤った結果を導く恐れがあるため、反応性生物は封じ込めた状態で検査する方法が好ましい。そのためには増幅反応液をそのままの状態を検出する方法が用いられる場合が多い。例えば、増幅反応液に核酸染色剤を共存させておき、核酸断片の増幅反応が起きるとそれに伴って染色剤が発色する原理に基づいた方法が挙げられる (Wittwer, C. T. et al., BioTechniques 22, 176-181 (1997))。また、モレキュラービーコン法のように配列特異的検出においても、あらかじめ特殊な標識を施したプローブを共存させておくことにより増幅物の生成を蛍光の発光として検出してもよい (Tyagi, S. et al., Nature Biotechnology 14, 303-308 (1996))。

20

【0034】

核酸断片の増幅方法においては、増幅された核酸断片による汚染が深刻な問題を引き起こすことがある。それを克服する方法として、例えば増幅反応において伸長反応の基質の一つであるチミジン三リン酸の代わりにデオキシウリジン三リン酸を用い、増幅生成物のみを選択的にウラシルDNAグリコシラーゼで分解する方法がある (Longo, M. C. et al., Gene 93, 125-128 (1990))。本発明においても、必要に応じて、このような増幅物による汚染を除去する方法をさらに適用しても良い。

【0035】

30

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0036】

本実施例において用いられるオリゴヌクレオチドは、日本バイオサービスより購入した。また、Bst DNAポリメラーゼはNew England Biolabs, Inc. より購入し、反応には添付の反応バッファーを使用した。塩基配列の決定は、DNA sequencing kit (PE Applied Biosystems #43031521) を使用して反応し、ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems) により解析した。

40

【0037】

反応に使用した鋳型およびプライマーオリゴヌクレオチドは、それぞれ以下の通りであった。

鋳型 1 : XT1

5' CATCAAGGGTCCCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGG
ATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACCCCTTGATG

鋳型 2 : XT2

5' CATCAAGGGTCCCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGG
ATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTAT

鋳型 3 : XT3

50

5' CTGCACCTGTGACAAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTT
CAGGGTGAGTCTAT

プライマー 1 (鋳型に相補的) : XPA1

5' CACAGTGCAGATAGACTCAC

プライマー 2 (鋳型に相補的) : XPA2

5' CCACGTGCAGCTTGTCAACAG

プライマー 3 (鋳型と同一鎖) : XPS1

5' CTGCACGTGGATCCTGAGAA

プライマー 4 (鋳型と同一鎖) : XPS2

5' CCTGAGAACTTCAGGGTGAG

10

【0038】

鋳型 1 は両末端側に 13 塩基からなる逆行反復配列を含むものであり、また鋳型 2 は 3' 側の逆行反復配列を除いたものである。鋳型 3 は両方の逆行反復配列を除いたもので増幅しようとする配列のみからなるものである。

プライマー 1 とプライマー 2 は、鋳型に相補的な配列である。このうち、プライマー 1 は、増幅する断片の 5' 末端側と 3' 末端側に相補的であり、プライマー 2 は、鋳型の連続した部分に相補的である。プライマー 3 とプライマー 4 は、それぞれ鋳型の連続した部分の一部と同一の配列である。

下記表 1 に示したような組み合わせ (テスト No. 1 ~ 12) で、前記した鋳型 (1 ピコモル) とプライマー (16 ピコモル) のうちから任意のものを選択して混合し、そこに 4 種のデオキシヌクレオチド三リン酸 (200 マイクロモル) と反応バッファーとを加えた後、94℃で30秒間変成させた。次いで、60℃で1分間アニーリングを行った。なお、ここで反応液の全量は 60 μL であった。ここで Bst DNA ポリメラーゼ 4 ユニットを加えた後、60℃で2時間反応を行った。

20

【0039】

表 1

No.	鋳型	プライマー
1	XT1	XPA1
2	XT1	XPA1, XPS1
3	XT1	XPA2
4	XT1	XPA2, XPS2
5	XT2	XPA1
6	XT2	XPA1, XPS1
7	XT2	XPA2
8	XT2	XPA2, XPS2
9	XT3	XPA1
10	XT3	XPA1, XPS1
11	XT3	XPA2
12	XT3	XPA2, XPS2

30

40

【0040】

得られた各場合の反応液の一部を 2% アガロース電気泳動で分析した。

結果は図 7 に示される通りであった。なお、図 7 はエチジウムブロミドで染色した結果である。ここでは、プライマーを 2 種類加えた場合のみ増幅物と思われる核酸断片のスメア

50

一なバンドが見られた。プライマー 1 種類のみでは増幅が不十分で検出できないと思われた。

次に、バンドが見られた反応液に限り、さらに制限酵素 B a m H I で消化反応を行って、それを 10 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析した。

【 0 0 4 1 】

結果は図 8 に示される通りであった。

図 8 に示めされたように、テスト N o . 2、N o . 6、および N o . 10 のみ目的の長さの断片がみられ（52 塩基）、また、テスト N o . 4、N o . 8、および N o . 12 ではそれより鎖長の長いもの、または鎖長の短いバンドが見られた。また、テスト N o . 2、N o . 6、および N o . 10 の間で比較すると、N o . 2、N o . 6、N o . 10 の順

10

に目的のバンドが薄くなり、ステム構造が増幅の効率を高める効果があることが確かめられた。また、目的の増幅物と思われるバンドの塩基配列を確認したところ、鋳型 3 の配列と一致した。

【 0 0 4 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for amplifying an non-cyclic nucleic acid fragments
of interest

<130> 132198q

<140>

10

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

catcaagggt cccctgcact gtgacaagct gcacgtggat cctgagaact tcagggtgag 60
tctatgggac ccttgatg 78

30

<210> 2

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthtic DNA

<400> 2

40

catcaagggt cccctgcact gtgacaagct gcacgtggat cctgagaact tcagggtgag 60

tctat

65

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

ctgcactgtg acaagctgca cgtggatcct gagaacttca gggtagtct at

52

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

cacagtgcag atagactcac

20

<210> 5

30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

ccacgtgcag ctgtcacag

20

40

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

ctgcacgtgg atcctgagaa

20

10

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

cctgagaact tcagggtgag

20

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 鋳型となる鎖がニック様構造である場合の鎖置換伸長反応を模式的示した図である。

【図 2】 本発明の好ましい第 1 の態様の核酸断片の増幅方法の概略を示す図である。

30

【図 3】 本発明の好ましい第 2 の態様の核酸断片の増幅方法の概略を示す図である。

【図 4】 本発明の別の好ましい態様の核酸断片の増幅方法の概略を示す図である。

【図 5】 本発明の別のより好ましい態様の核酸断片の増幅方法の概略を示す図である。

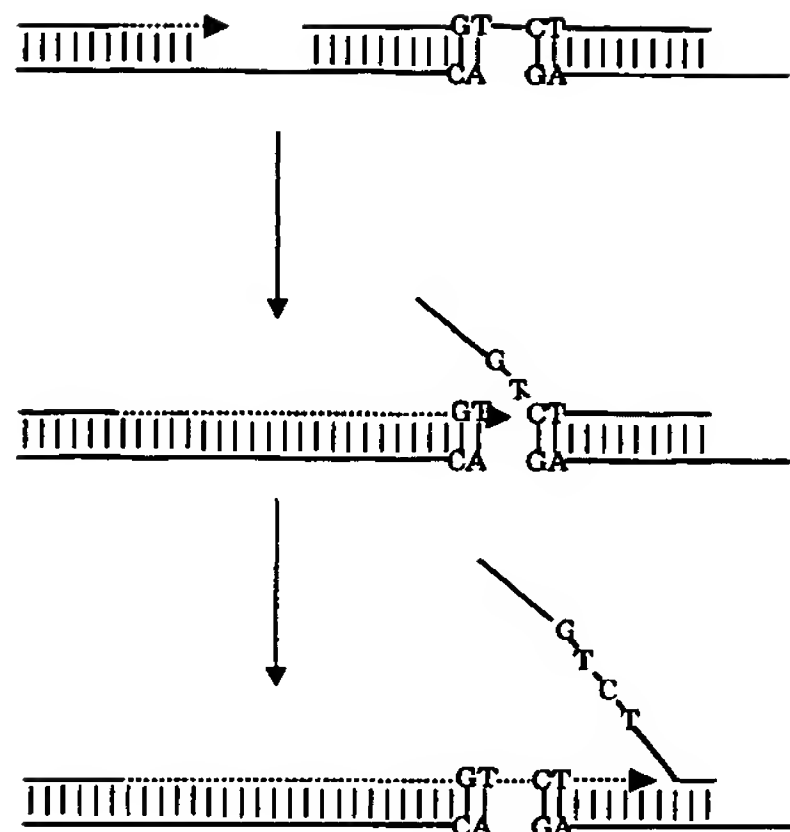
【図 6】 本発明の一つの好ましい態様の核酸断片の増幅方法の概略を示す図である。

【図 7】 実施例における試験の結果を示し、2%アガロース電気泳動を行った結果を示す。なお、ここで M はサイズマーカー（pUC19 の H a p I I 消化物）を示し、各レーン番号はそれぞれ実施例におけるテスト番号に対応する。

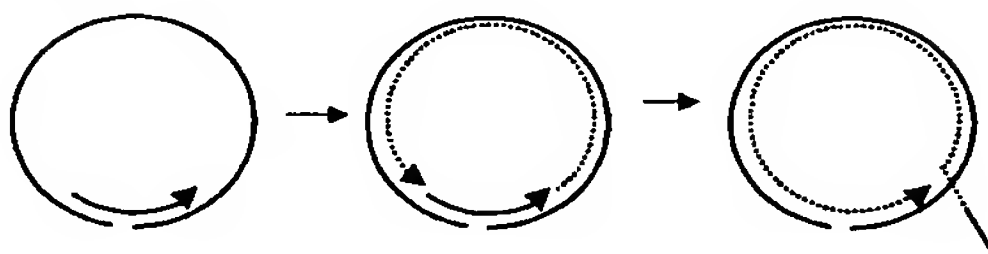
【図 8】 実施例における試験の結果を示し、10%ポリアクリルアミド電気泳動を行った結果を示す。なお、ここで M はサイズマーカー（10塩基ラダー：G i b c o B R L # 10821-015）を示し、各レーン番号はそれぞれ実施例におけるテスト番号に対応し、また、「→」は 100 塩基に対応する。

40

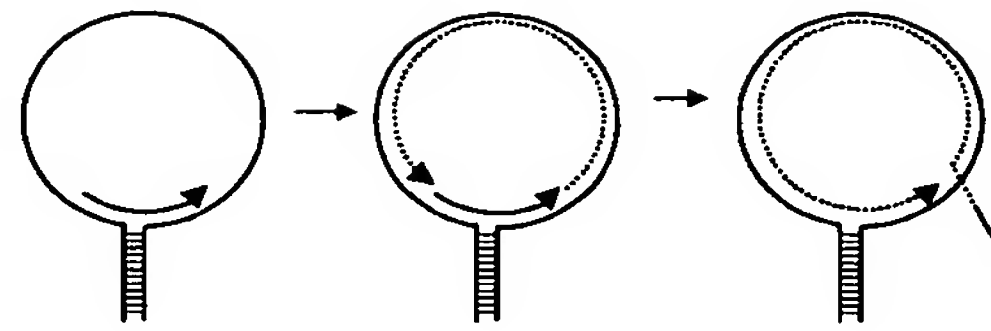
【図 1】



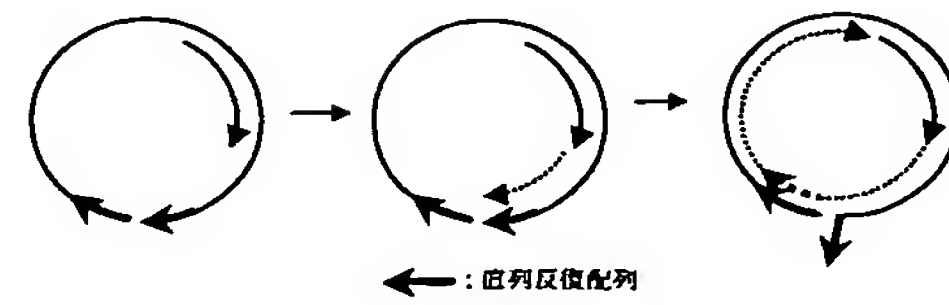
【図 2】



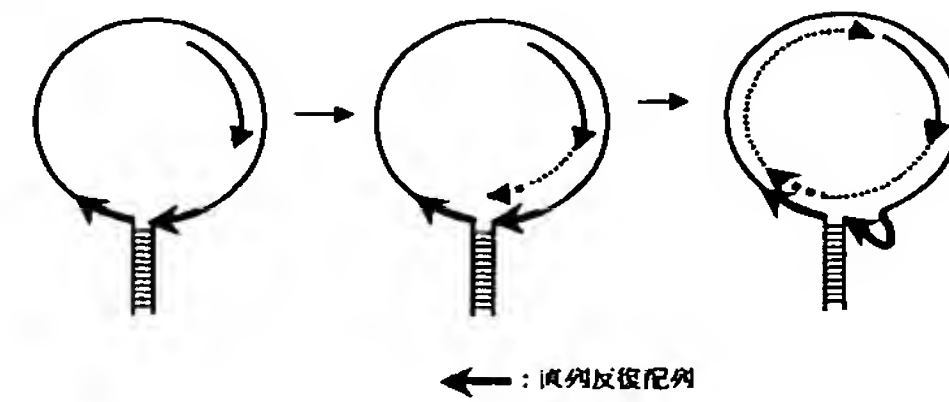
【図 3】



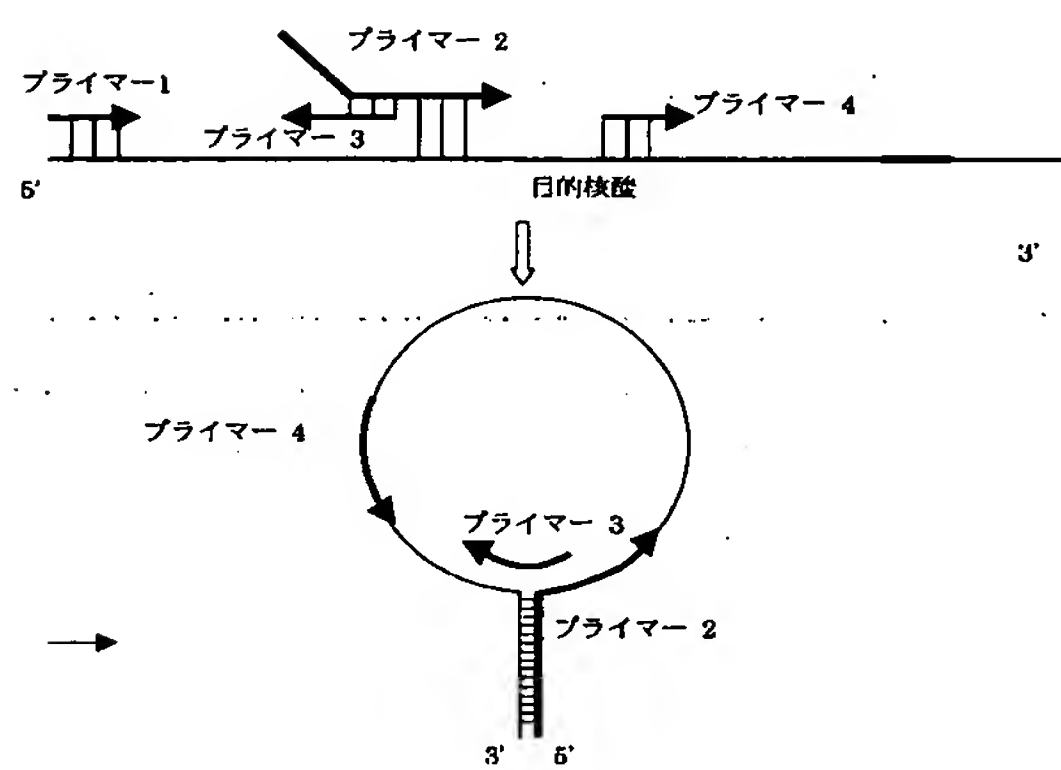
【図 4】



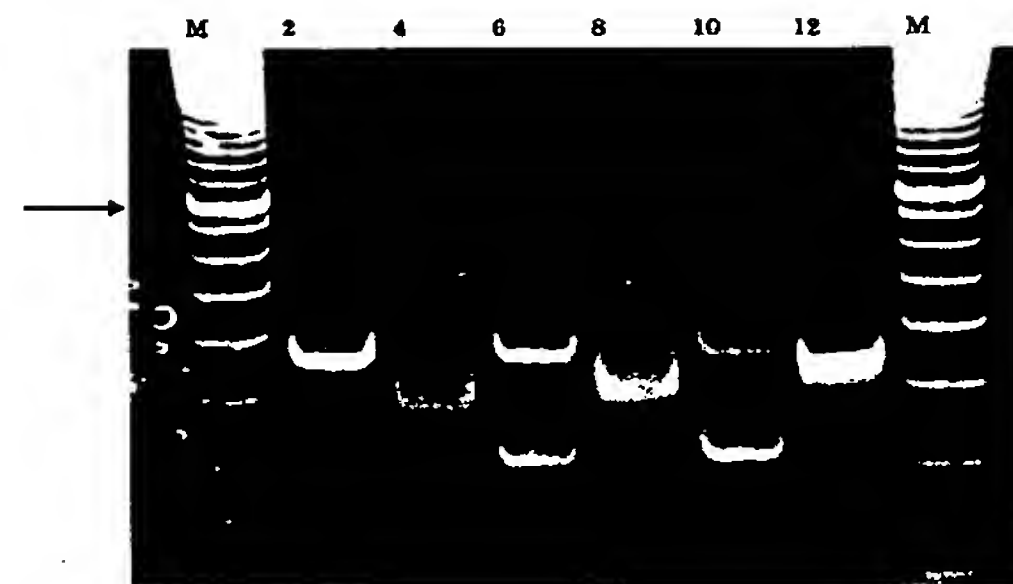
【図 5】



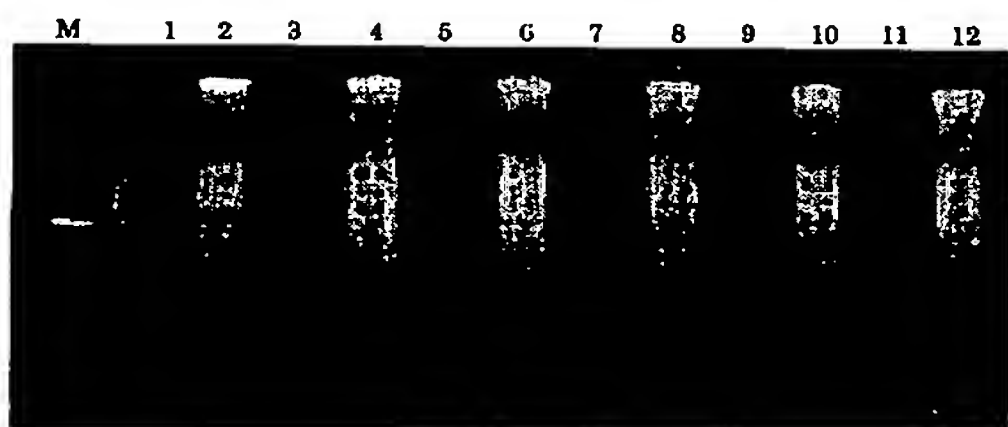
【図 6】



【図 8】



【図 7】



フロントページの続き

(72)発明者 山 根 明 男

広島県高田郡甲田町下甲立1 6 2 4 湧永製薬株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 HA19